Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay

In-vitro-Diagnostikum.

Nur zum US-Export.

Allgemeine Informationen 2
Verwendungszweck 2
Zusammenfassung und Testerklärung 2
Testprinzip 3
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen 4
Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien 7
Probenentnahme und -lagerung 8
Proben auf dem Panther System 11
Transport von Patientenproben 11
Panther System 12
Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien 12
Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien 13
Optionale Materialien 14
Testverfahren mit dem Panther System 15
Verfahrenshinweise 20
Qualitätskontrolle 21
Assay-Kalibrierung 21
Negativ- und Positivkontrollen 21
Interner Kalibrator/Interne Kontrolle 21
Testauswertung 22
Ergebnisse 22
Einschränkungen 23
Leistung 24
Nachweisgrenze 24
Nachweisgrenze bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen 24
Linearer Bereich 25
Linearität bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen 26
Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze mithilfe des 3. internationalen WHO-Standards . . 27
Verifizierung der LLOQ bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen 28
Präzision 28
Stoffe mit möglicher beeinträchtigender Wirkung 29
Spezifität 31
Analytische Spezifität 32
Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben 33
Probenverdünnung mit Probenverdünner 33
Methodenkorrelation 34
Diagnostische Übereinstimmung 35
Verschleppung 35
Serokonversionspanel 35
Serum, Plasmaäquivalenz-Studie 36
Bibliographie 37

Allgemeine Informationen

Verwendungszweck

Der Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay ist ein *In-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zum Nachweis und zur Quantifizierung von RNA des humanen Immunschwächevirus Typ 1 (HIV-1) auf dem voll automatisierten Panther® System. Er ist zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Diagnose einer HIV-1-Infektion, zur Bestätigung einer HIV-1-Infektion und als Hilfsmittel beim klinischen Management von Patienten mit HIV-1-Infektion bestimmt.

Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay kann als Hilfsmittel bei der Diagnose eine HIV-1-Infektion, einschließlich einer Akut- oder Primärinfektion, verwendet werden. Das Vorhandensein von HIV-1-RNA im Plasma oder Serum von Patienten ohne Antikörper gegen HIV-1 weist auf eine akute oder primäre HIV-1-Infektion hin. Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay kann ergänzend zur Testung von Patientenproben eingesetzt werden, die in zugelassenen HIV-Immunassays mehrmals reaktiv waren. Erweist sich eine solche Patientenprobe im Aptima HIV-1 Quant Dx Assay als reaktiv, ist dies eine Bestätigung der HIV-1-Infektion.

Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay kann auch in Verbindung mit dem klinischen Bild und anderen Labormarkern zur Krankheitsprognose bei HIV-1-Infizierten angewendet werden. Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay kann als Hilfsmittel zur Überwachung der Wirksamkeit einer antiretroviralen Behandlung durch Messen von Veränderungen der HIV-1-RNA-Konzentration im Plasma herangezogen werden.

Wenn der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay als Hilfsmittel zur Diagnose einer HIV-1-Infektion verwendet wird, muss die Leistung hinsichtlich qualitativer Ergebnisse sowohl mit Plasma- als auch mit Serumproben festgestellt werden. Bei Verwendung als Hilfsmittel bei der Überwachung der Wirksamkeit einer antiretroviralen Therapie muss die Leistung hinsichtlich quantitativer Ergebnisse lediglich mit Plasmaproben festgestellt werden. Serumproben können für quantitative Ergebnisse nicht verwendet werden.

Dieser Assay ist nicht für die Verwendung beim Screening von Blut- oder Plasmaspendern bestimmt.

Zusammenfassung und Testerklärung

Epidemiologische Studien identifizierten das humane Immunschwächevirus Typ 1 (HIV-1) als Etiological Agent des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS) (1-7). HIV kann durch sexuellen Kontakt, Exposition gegenüber infiziertem Blut oder infizierten Blutprodukten oder von einer HIV-positiven Mutter auf das ungeborene Kind übertragen werden (8). Nach einer HIV-Exposition entwickeln die Infizierten innerhalb von 3 bis 6 Wochen im Allgemeinen ein kurzes, akutes Syndrom mit grippeartiger Symptomatik und ausgeprägter Virämie im peripheren Blut (9-12). Bei den meisten Infizierten folgt auf diese Frühphase eine HIV-spezifische Immunreaktion und ein Rückgang der Plasmavirämie, in der Regel innerhalb von 4 bis 6 Wochen nach Symptombeginn (13-14). Nach der Serokonversion tritt bei den Infizierten normalerweise eine klinische stabile, asymptomatische Phase ein, die jahrelang andauern kann (15-17). Die asymptomatische Phase ist durch persistierende, geringe Plasmavirämie (18) und eine allmähliche Depletion von CD4-positiven T-Lymphozyten gekennzeichnet. Diese Depletion führt zu gravierender Immunschwäche, multiplen opportunistischen Infektionen, Tumorerkrankungen und zum Tod (19). Wenngleich die Viruszahl im peripheren Blut in der asymptomatischen Phase der Infektion relativ niedrig ist, scheint es sich bei der Replikation und Beseitigung des Virus um dynamische Prozesse zu handeln, bei denen sich eine rasche Virusbildung und die Infektion von CD4-positiven Zellen mit einer gleich raschen Viruseliminierung, dem Tod infizierter Zellen und

der Erneuerung von CD4-positiven Zellen die Waage halten, sodass die Plasmavirämie und die Zahl der CD4-positiven Zellen relativ stabil bleiben (20-22).

Quantitative Messungen von HIV im peripheren Blut haben gezeigt, dass höhere Viruszahlen möglicherweise mit einem erhöhten Risiko einer klinischen Progression von HIV-assoziierten Krankheiten einhergehen, Verringerungen der Viruszahl im Plasma dagegen mit einem verringerten Risiko für eine klinische Progression (23-25). Die Viruszahl im peripheren Blut lässt sich durch Messung des HIV p24-Antigens im Serum, durch quantitative Kultur von HIV aus Plasma oder durch direkte Messung viraler RNA im Plasma mittels Nukleinsäure-Amplifikations- oder Signalamplifikationstechnologien quantifizieren (26-30).

Die Detektion einer HIV-1-Infektion beruht derzeit in erster Linie auf serologischen Tests auf Antikörper und/oder p24-Antigen mit einem Immunassay. Die US-amerikanischen Centers for Disease Control empfehlen die Verwendung eines Antikörper- und RNA-Tests zur Diagnose einer akuten HIV-Infektion (31). Wenngleich sich die Empfindlichkeit der Detektion von Antikörpern gegen HIV-1 und p24-Antigen verbessert hat, besteht nach wie vor ein Zeitfenster zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und dem Zeitpunkt der Detektion anhand von serologischen Markern. Dieses Zeitfenster hängt von der Empfindlichkeit des verwendeten serologischen Tests ab. Einer Schätzung (32) zufolge können die p24-Antigen/Antikörper-Assays der 4. Generation eine Infektion nachweisen, wenn die HIV-1-RNA-Konzentration 14.000 Kopien/ml erreicht hat. Die Nachweisgrenze des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays liegt erheblich unter 14.000 Kopien/ml und könnte das Vorhandensein von HIV-1 früher als HIV-Immunassays nachweisen.

Testprinzip

Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay umfasst drei Hauptschritte, die alle in einem einzigen Röhrchen auf dem Panther® System stattfinden: Target Capture, Target-Amplifikation durch transkriptionsvermittelte Amplifikation (Transcription-Mediated Amplification, TMA) und Detektion der Amplifikationsprodukte (Amplikons) mithilfe der fluoreszenzmarkierten Sonden (Fackeln).

Während des Target Capture wird virale RNA aus Patientenproben isoliert. Die Patientenprobe wird mit einem Detergens behandelt, um die Virushülle zu solubilisieren, Proteine zu denaturieren und die genomische Virus-RNA freizusetzen. Capture-Oligonukleotide hybridisieren an hoch konservierte Regionen der ggf. in der Testprobe vorhandenen HIV-1-RNA. Das hybridisierte Target wird anschließend auf magnetischen Mikropartikeln gebunden, die dann in einem Magnetfeld von der Patientenprobe getrennt werden. Irrelevante Bestandteile werden durch Waschschritte aus dem Reaktionsröhrchen entfernt.

Die Target-Amplifikation findet durch TMA statt, eine transkriptionsbasierte Nukleinsäureamplifikationsmethode, bei der zwei Enzyme, die reverse Transkriptase des MMLV (Moloney murines Leukämievirus) und die T7-RNA-Polymerase zum Einsatz kommen. Die reverse Transkriptase erzeugt eine DNA-Kopie (mit einer Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase) der Targetsequenz. Die T7-RNA-Polymerase produziert mehrere Kopien des RNA-Amplikons vom Template der DNA-Kopie. Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay verwendet die TMA-Methode zur Amplifizierung von zwei Regionen in der HIV-1-RNA (Pol und LTR). Zur Amplifikation dieser bestimmten Regionen werden spezielle Primer zur Amplifizierung der HIV-1-Gruppen M, N und O verwendet. Das Design der Primer und der Ansatz mit zwei Targets gewährleisten eine akkurate Detektion und Quantifizierung von HIV-1.

Die Detektion wird erreicht, indem einzelsträngige Nukleinsäure-Fackeln verwendet werden, die während der Amplifikation des Targets vorhanden sind und spezifisch und in Echtzeit an das Amplikon hybridisieren. Jede Fackel hat ein Fluorophor und einen Quencher. Wenn die Fackel nicht mit dem Amplikon hybridisiert, befindet sich der Quencher nahe bei dem Fluorophor und

unterdrückt die Fluoreszenz. Bindet die Fackel jedoch an das Amplikon, ist der Abstand zwischen Quencher und Fluorophor größer, sodass dieses bei Anregung mit einer Lichtquelle ein Signal mit einer bestimmten Wellenlänge abgibt. Je mehr Fackeln an Amplikons hybridisieren, desto stärker ist das erzeugte Fluoreszenzsignal. Der Zeitraum, der verstreicht, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat, ist zur HIV-1-Ausgangskonzentration proportional. Jede Reaktion hat einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (Internal Control, IC) zur Überprüfung auf Schwankungen bei der Probenbearbeitung, Amplifikation und Detektion. Die Konzentration einer Probe wird von der Panther System Software bestimmt, indem die HIV-1- und IC-Signale in jeder Reaktion mit Kalibrierungsdaten verglichen werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

A. *In-vitro*-Diagnostikum.

B. Zur Verringerung des Risikos ungültiger Ergebnisse müssen die Packungsbeilage und das *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) vollständig durchgelesen werden, bevor dieser Assay durchgeführt wird.

Laborbezogen

C. VORSICHT: Die Kontrollen für diesen Assay enthalten Humanplasma. In von der US-amerikanischen Food and Drug Administration zugelassenen Verfahren ist das Plasma negativ auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen HCV, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 und HIV-Antigen. Das Plasma ist außerdem bei Testung mit zugelassenen Nukleinsäuretests von Probenpools nicht-reaktiv auf HCV-RNA und HIV-1-RNA. Alle aus Humanblut stammenden Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und mit den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln (33-35).

D. Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays und in der Handhabung potenziell infektiösen Materials entsprechend geschult sind. Verschüttungen sind unter Einhaltung entsprechender vor Ort gültiger Verfahren sofort zu desinfizieren.

E. Nur die im Lieferumfang enthaltenen oder angegebenen Einweg-Laborprodukte verwenden.

F. Die normalen Vorsichtsmaßnahmen im Labor ergreifen. Nicht mit dem Mund pipettieren. In den ausgewiesenen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen. Ungepuderte Einweghandschuhe, Augenschutz und Laborkittel beim Umgang mit Proben und Kitreagenzien tragen. Nach der Handhabung von Proben und Kitreagenzien die Hände gründlich waschen.

G. Arbeitsflächen, Pipetten und andere Geräte müssen regelmäßig mit einer 2,5-%igen bis 3,5-%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung dekontaminiert werden.

H. Material, das in Kontakt mit Patientenproben und Reagenzien gelangt ist, nach allen geltenden Vorschriften entsorgen (33-36). Alle Arbeitsflächen gründlich reinigen und desinfizieren.

I. Die Kontrollen enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Für den Reagenzientransfer keinen Metallröhrchen verwenden. Wenn Lösungen mit Natriumazidverbindungen in ein Rohrsystem entsorgt werden, sind sie zu verdünnen und mit reichlichen Mengen an fließendem Leitungswasser hinuntergespült werden. Diese Vorsichtsmaßnahmen werden

empfohlen, um die Ansammlung von Ablagerungen in Metallrohren und ein dadurch bedingtes Explosionsrisiko zu vermeiden.

J. Zu der guten Standardpraxis für Molekularbiologie-Laboratorien gehört auch die Überwachung der Laborumgebung. Zur Überwachung der Laborumgebung wird folgende Vorgehensweise empfohlen.
   1. Einen Tupfer mit Wattespitze und ein SAT bereitlegen.
   2. Jedes SAT entsprechend beschriften.
   3. Jedes SAT mit 1 ml Aptima Probenverdünner füllen
   4. Zur Erfassung der Oberflächenproben einen Tupfer leicht mit nukleasefreiem entionisiertem Wasser befeuchten.
   5. Den Tupfer auf der betreffenden Oberfläche in einer vertikalen Bewegung von oben nach unten führen. Während der Probengewinnung den Tupfer etwa eine halbe Drehung drehen.
   6. Die Tupferprobe sofort in das Röhrchen geben und in dem Verdünner vorsichtig schwenken, um möglicherweise auf dem Tupfer vorhandenes Material zu extrahieren. Den Tupfer an der Seite des Transportröhrchens ausdrücken, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu extrahieren. Den Tupfer entsorgen und das Röhrchen mit der Kappe verschließen.
   7. Die Schritte mit den verbleibenden Tupferproben wiederholen.
   8. Die Tupferprobe mit dem molekularen Assay testen.

Probenbezogen

K. Proben können infektiös sein. Bei der Durchführung dieses Assays sind die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen (33-35) zu befolgen. Entsprechend den vor Ort geltenden Bestimmungen sind angemessene Handhabungs- und Entsorgungsmethoden festzulegen (36). Dieses Verfahren sollte nur von Personen durchgeführt werden, die in der Anwendung des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays und in der Handhabung infektiösen Materials entsprechend geschult sind.

L. Um die Probenintegrität zu wahren, müssen während des Probenversands die ordnungsgemäßen Lagerbedingungen aufrecht erhalten werden. Die Probenstabilität unter anderen Versandbedingungen als den hier empfohlenen wurde nicht beurteilt.

M. Kreuzkontamination in den Probenbehandlungsschritten vermeiden. Insbesondere ist darauf zu achten, beim Lösen oder Entfernen von Kappen von Patientenproben eine Kontamination durch Verbreitung von Aerosolen zu vermeiden. Die Proben können sehr hohe Konzentrationen von Organismen aufweisen. Es ist sicherzustellen, dass die Probenbehälter nicht miteinander in Berührung kommen. Benutzte Materialien dürfen nicht über offene Behälter hinweg entsorgt werden. Wechseln Sie die Handschuhe, wenn sie mit Proben in Kontakt kommen.

Assaybezogen

N. Quantitative Ergebnisse des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays wurden mit Plasma evaluiert. Serum kann für quantitative Ergebnisse nicht verwendet werden. Qualitative Ergebnisse wurden sowohl mit Plasma als auch mit Serum evaluiert.

O. Das Reagenzien-Kit, den Kalibrator oder die Kontrollen nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.

P. Assay-Reagenzien aus Kits mit verschiedenen Hauptchargennummern nicht austauschen, vermischen oder kombinieren. Assay-Flüssigkeiten können verschiedene Chargennummern aufweisen. Kontrollen und Kalibratoren können verschiedene Chargennummern aufweisen.

Q. Eine mikrobielle und Nuklease-Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden.

R. Alle Assay-Reagenzien verschließen und bei den angegebenen Temperaturen lagern. Die Assayleistung kann durch Verwendung von falsch gelagerten Assay-Reagenzien beeinträchtigt sein. Für weitere Informationen siehe *Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien* und *Testverfahren mit dem Panther System*.

S. Assay-Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht kombinieren, außer auf ausdrückliche Anweisung. Füllen Sie Reagenzien oder Flüssigkeiten nicht nach. Das Panther System überprüft die Reagenzien-Füllstände.

Lagerungs- und Handhabungsbedingungen für Reagenzien

A. Die folgende Tabelle zeigt die Lagerungsbedingungen und die Stabilität der Reagenzien, der Kontrollen und des Kalibrators.

Reagenz	Lagerung im ungeöffneten Zustand	Offenes Kit (rekonstituiert)	
		Lagerung	Stabilität
qHIV-1-Amplifikationsreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHIV-1-Amplifikationsrekonstitutionslösung	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage[a]
qHIV-1-Enzymreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHIV-1-Lösung zur Enzymrekonstitution	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage[a]
qHIV-1-Promotorreagenz	2 °C bis 8 °C		
qHIV-1-Lösung zur Promotorrekonstitution	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage[a]
qHIV-1-Target Capture-Reagenz	2 °C bis 8 °C	2 °C bis 8 °C	30 Tage[a]
qHIV-1 CONTROL – (Negativkontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 20 Stunden verwenden
qHIV-1 CONTROL + L (schwach positive Kontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 20 Stunden verwenden
qHIV-1 CONTROL + H (stark positive Kontrolle)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 20 Stunden verwenden
qHIV-1 PCAL (Positivkalibrator)	-15 °C bis -35 °C	15 °C bis 30 °C	Fläschchen für den Einmalgebrauch Innerhalb von 20 Stunden verwenden

[a] Wenn Reagenzien aus dem Panther System genommen werden, sind sie sofort wieder bei ihren jeweiligen Lagerungstemperaturen aufzubewahren.

B. Alle unbenutzten rekonstituierten Reagenzien und das Target Capture-Reagenz (Target Capture Reagent, TCR) nach 30 Tagen oder nach Ablauf des Verfallsdatums der Hauptcharge (das frühere Datum ist ausschlaggebend) entsorgen.

C. Im Panther System gelagerte Reagenzien sind im Gerät 72 Stunden stabil. Reagenzien können bis zu 5 Mal auf das Panther System geladen werden. Das Laden von Reagenzien wird jedes Mal im Panther System-Protokoll vermerkt.

D. Nach dem Auftauen des Kalibrators muss die Lösung klar sein, d. h., keine Trübungen oder Präzipitate aufweisen.

E. ⚠ Das Promotorreagenz und das rekonstituierte Promotorreagenz sind lichtempfindlich. Diese Reagenzien sind lichtgeschützt zu lagern und für die Anwendung vorzubereiten.

Probenentnahme und -lagerung

Hinweis: *Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös zu handhaben. Es sind allgemeine Vorsichtsmaßnahmen zu treffen.*

Hinweis: *Bei den Schritten, die eine Handhabung von Proben erfordern, darauf achten, eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Benutztes Material ist beispielsweise so zu beseitigen, dass es nicht über geöffnete Röhrchen geführt wird.*

Es können in die folgenden Glas- oder Kunststoffröhrchen entnommene Vollblutproben verwendet werde:

Für quantitative Messungen:

- Röhrchen, die EDTA oder Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Antikoagulanzien enthalten, oder
- Plasmapräparationsröhrchen (Plasma Preparation Tubes, PPTs).

Für die qualitative Bestimmung:

- Röhrchen, die EDTA- oder ACD-Antikoagulanzien enthalten, oder
- PPTs, oder
- Serumröhrchen, oder
- Serumtrennröhren (Serum Separator Tubes, SSTs).

Bei Serum ist vor der Weiterverarbeitung die Koagelbildung abzuwarten.

A. Probenentnahme

   Vollblut kann bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden und ist innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme zu zentrifugieren. Plasma oder Serum unter Einhaltung der Herstelleranweisungen für das jeweils verwendete Röhrchen vom Erythrozytenpellet trennen. Plasma oder Serum kann im primären Röhrchen auf dem Panther System getestet oder zuerst in ein sekundäres Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) überführt und dann auf dem Panther System getestet werden. Das Mindestvolumen für primäre Entnahmeröhrchen beträgt 1200 µl bzw. 700 µl bei SATs.

   Wird der Test nicht sofort durchgeführt, können Plasma und Serum nach den nachstehenden Spezifikationen gelagert werden. In ein SAT überführtes Plasma kann bei -20 °C oder -70 °C eingefroren werden. Serum kann bei -20 °C eingefroren werden. Die Proben sollten höchstens dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, um Auswirkungen auf das Ergebnis zu vermeiden. Patientenproben nicht in EDTA-, ACE- oder primären Serumentnahmeröhrchen einfrieren.

B. Bedingungen für die Lagerung von Patientenproben

   1. EDTA- und ACD-Plasmaproben

      Primärröhrchen mit zentrifugiertem Plasma können nach der Probenentnahme bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden (Abbildung 1, oberes Rahmenfeld). Nach 24 Stunden kann das Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden (Abbildung 1, untere Rahmenfelder):

      - Im primären Entnahmeröhrchen bis zu 3 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
      - im SAT bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
      - im SAT bis zu 90 Tage lang bei -20 °C oder -70 °C.

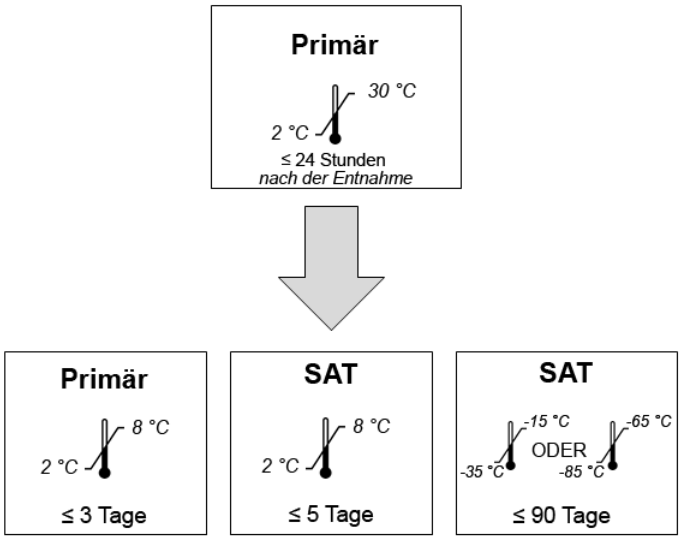

Abbildung 1. Bedingungen für die Lagerung von EDTA/ACD-Primärröhrchen

2. PPT-Patientenproben

   PPTs mit zentrifugiertem Plasma können nach der Probenentnahme bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden (Abbildung 2, oberes Rahmenfeld). Nach 24 Stunden kann das Plasma unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden (Abbildung 2, untere Rahmenfelder):

   - Im PPT bis zu 3 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C,
   - im SAT bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
   - im PPT oder SAT bis zu 90 Tage lang bei -20 °C oder -70 °C.

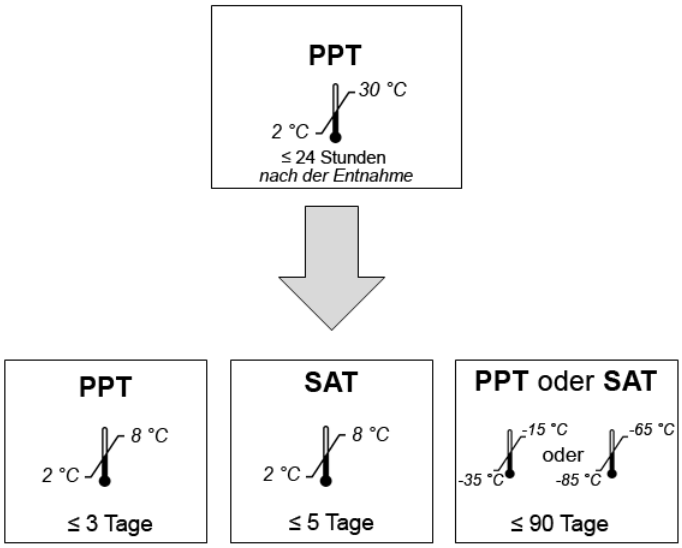

Abbildung 2. Bedingungen für die Lagerung von PPTs

3. Patientenproben in Serumröhrchen

   Serumröhrchen mit zentrifugiertem Serum können nach der Probenentnahme bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden (Abbildung 3, oberes Rahmenfeld). Nach 24 Stunden kann das Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden (Abbildung 3, untere Rahmenfelder):

   - Im Serumröhrchen bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C,
   - im SAT bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
   - im SAT bis zu 7 Tage lang bei -20 °C.

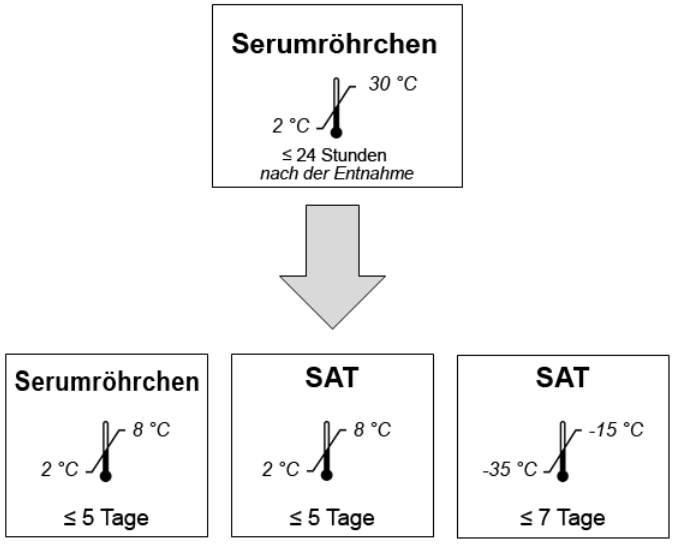

Abbildung 3. Bedingungen für die Lagerung von Serumröhrchen

4. SST-Patientenproben

   SSTs mit zentrifugiertem Serum können nach der Probenentnahme bis zu 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden (Abbildung 4, oberes Rahmenfeld). Nach 24 Stunden kann das Serum unter einer der folgenden Bedingungen längere Zeit gelagert werden (Abbildung 4, untere Rahmenfelder):

   - Im den SSTs bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C,
   - im SAT bis zu 5 Tage lang bei 2 °C bis 8 °C oder
   - im SAT bis zu 7 Tage lang bei -20 °C.

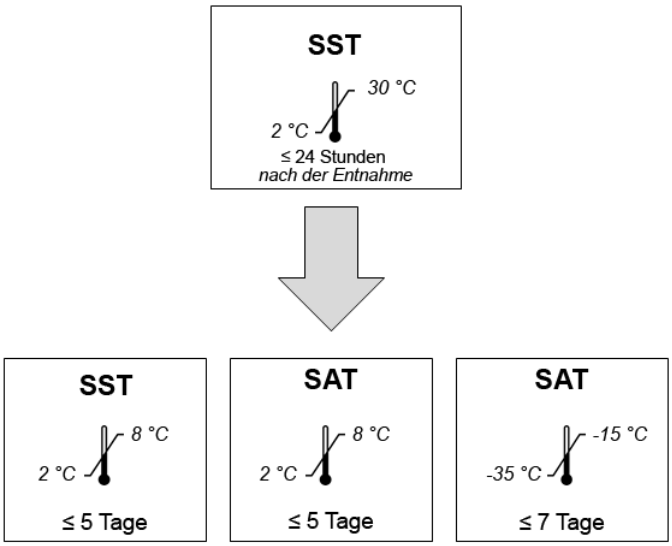

Abbildung 4. Bedingungen für die Lagerung von SSTs

C. Verdünnung von Plasmaproben

Eine Plasmaprobe kann für die Analyse auf dem Panther System in einem SAT verdünnt werden. Für weitere Informationen siehe *Testverfahren mit dem Panther System*, Schritt E.6.

Wenn eine Patientenprobe verdünnt wird, sollte sie sofort nach dem Verdünnung analysiert werden. Eine verdünnte Patientenprobe nicht einfrieren.

Proben auf dem Panther System

Proben können insgesamt bis zu 8 Stunden lang unverschlossen auf dem Panther System stehen gelassen werden. Solange die Gesamtverweildauer auf dem System vor dem Pipettieren der Probe vom Panther System 8 Stunden nicht übersteigt, können die Proben wieder aus dem Panther System genommen und getestet werden.

Transport von Patientenproben

Es ist auf Einhaltung der Probenlagerungsbedingungen entsprechend der Beschreibung unter *Probenentnahme und -lagerung* zu achten.

Hinweis: *Ein Versand der Patientenproben muss in Übereinstimmung mit geltenden nationalen, internationalen und regionalen Frachtbestimmungen erfolgen.*

Panther System

Nachstehend sind die Reagenzien für den Aptima HIV-1 Quant Dx Assay für das Panther System gelistet. Die Symbole zur Identifikation der Reagenzien sind neben dem Reagenznamen angegeben.

Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien und Materialien

Hinweis: *Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.*

Aptima HIV-1 Quant Dx Assay-Kit, 100 Tests, Kat.-Nr. PRD-03000 (1 Assay-Box, 1 Kalibrator-Kit, und 1 Kit mit Kontrollen)

Aptima HIV-1 Quant Dx Assay-Box
(Lagerung bei 2 °C bis 8 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
A	**qHIV-1-Amplifikationsreagenz** *Nicht-infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet, in Pufferlösung.*	1 Fläschchen
E	**qHIV-1-Enzymreagenz** *Reverse Transkriptase und RNA-Polymerase, getrocknet, in HEPES-gepufferter Lösung.*	1 Fläschchen
PRO	**qHIV-1-Promotorreagenz** *Nicht-infektiöse Nukleinsäuren, getrocknet, in Pufferlösung.*	1 Fläschchen
AR	**qHIV-1-Amplifikationsrekonstitutionslösung** *Wässrige Lösung mit Glyzerol und Konservierungsmitteln.*	1 x 7,2 ml
ER	**qHIV-1-Lösung zur Enzymrekonstitution** *HEPES-gepufferte Lösung mit oberflächenaktiver Substanz und Glyzerol.*	1 x 5,8 ml
PROR	**qHIV-1-Lösung zur Promotorrekonstitution** *Wässrige Lösung mit Glyzerol und Konservierungsmitteln.*	1 x 4,5 ml
TCR	**qHIV-1-Target Capture-Reagenz** *Nukleinsäuren in einer gepufferten Salzlösung mit nicht-infektiösen Nukleinsäuren in der Festphase und einem internen Kalibrator.*	1 x 72,0 ml
	Rekonstitutionsverbindungsstücke	3
	Barcode-Blatt für Hauptcharge	1 Blatt

Kit mit Aptima HIV-1 Quant Dx Kontrollen (Kat.-Nr. PRD-03002)
(Lagerung bei -15 °C bis -35 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
NC	**qHIV-1 Negativkontrolle** *HIV-1-negatives defibriniertes Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.*	5 x 1,5 ml
LPC	**qHIV-1 schwach positive Kontrolle** *Nicht-infektöse HIV-1-Armored RNA in defibriniertem Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.*	5 x 1,5 ml
HPC	**qHIV-1 stark positive Kontrolle** *Nicht-infektöse HIV-1-Armored RNA in defibriniertem Humanplasma mit Gentamicin und 0,2% Natriumazid als Konservierungsmittel.*	5 x 1,5 ml
	Barcode-Etikett der Kontrolle	—

Aptima HIV-1 Quant Dx-Kalibrator-Kit (Kat.-Nr. PRD-03001)
(Lagerung bei -15 °C bis -35 °C nach Empfang)

Symbol	Komponente	Menge
PCAL	**qHIV-1 Positivkalibrator** *Transkript in gepufferter Lösung.*	5 x 2,5 ml
	Barcode-Etikett des Kalibrators	—

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Hinweis: *Materialien, die von Hologic erhältlich sind, sind mit der Katalognummer aufgeführt, sofern nicht anders angegeben.*

Material	Kat.-Nr.
Panther System	303095
Aptima Assayflüssigkeitskit *enthält Aptima Waschlösung, Aptima Puffer für Deaktivierungsflüssigkeit und Aptima Ölreagenz*	303014 (1000 Tests)
Multi-Röhrchen-Einheiten (multi-tube units, MTUs)	104772-02
Panther Entsorgungsbeutel-Kit	902731
Panther Abfallabdeckung	902714
Oder Panther Durchlaufkit für Echtzeit-Assay *enthält MTUs, Entsorgungsbeutel, Abfallabdeckungen und Assayflüssigkeiten*	PRD-03455 (5000 Tests)
Spitzen, 1000 µl, leitfähig, zur Flüssigkeitsstandmessung	10612513 (Tecan)
Bleichmittel, 5% bis 7% (0,7 M bis 1,0 M) Natriumhypochloritlösung	—
Ungepuderte Einweghandschuhe	—

Ersatzkappen, undurchlässig	103036A
Ersatzkappen für Reagenzien	
Lösungen zur Rekonstitution von Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenz	*CL0041 (100 Kappen)*
TCR	*CL0040 (100 Kappen)*
Labortischunterlagen mit Kunststoffunterschicht auf der Rückseite	—
Fusselfreie Tücher	—
Pipettierer	—
Spitzen	—
Es können primäre Entnahmeröhrchen mit folgenden Abmessungen verwendet werden: *13 mm x 100 mm* *13 mm x 75 mm* *16 mm x 100 mm*	—
Zentrifuge	—
Vortexer	—

Optionale Materialien

Material	**Kat.-Nr.**
Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tubes, SAT) (100 St.)	503762
Kappe für Transportröhrchen (100 St.) *Kappe für SAT*	504415
Aptima Probenverdünner	PRD-03003
Kit mit zusätzlichen Aptima HIV-1 Quant Dx Assay-Kontrollen	PRD-03002
Kit mit zusätzlichem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay-Kalibrator	PRD-03001
Transferpipetten	—
Handelsübliche Panels, z. B.: *HIV-1 von Quality Control for Molecular Diagnostics oder* *Panel des College of American Pathologists zur Erhebung der HIV-Viruslast oder* *SeraCare ACCURUN HIV-Panels*	—
Wattestäbchen	—
Schwenkvorrichtung für Röhrchen	—

Testverfahren mit dem Panther System

Hinweis: *Nähere Verfahrensinformationen finden Sie im Panther System Operator's Manual (Bedienungsanleitung für das Panther System).*

A. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

1. Reinigen Sie die Arbeitsflächen, wo die Reagenzien vorbereitet werden. Wischen Sie die Arbeitsflächen mit einer 2,5%igen bis 3,5%igen (0,35 M bis 0,5 M) Natriumhypochloritlösung ab. Lassen Sie die Natriumhypochloritlösung mindestens 1 Minute auf den Flächen einwirken. Spülen Sie sie anschließend mit entionisiertem Wasser ab. Die Natriumhypochloritlösung darf nicht antrocknen. Decken Sie die Arbeitsfläche, auf der die Reagenzien und Proben vorbereitet werden, mit sauberen, absorbierenden Labortischunterlagen mit Kunststoffunterschicht ab.
2. Reinigen Sie eine separate Arbeitsfläche, wo die Proben vorbereitet werden. Gehen Sie dabei vor, wie vorstehend beschrieben (Schritt A.1).
3. Reinigen Sie alle Pipettierer. Gehen Sie dabei vor, wie vorstehend beschrieben (Schritt A.1).

B. Vorbereitung von Kalibrator und Kontrollen

Lassen Sie den Kalibrator und die Kontrollen vor der Verarbeitung eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C annehmen, indem Sie folgenderweise vorgehen:

1. Nehmen Sie den Kalibrator und die Kontrollen aus der Lagerung (-15 °C bis -35 °C) und bringen Sie sie auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Drehen Sie jedes Röhrchen während des gesamten Auftauprozesses um, um den Inhalt gründlich zu mischen. Es ist darauf zu achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch komplett aufgetaut ist.

   Option. Die Röhrchen mit dem Kalibrator und den Kontrollen können auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung platziert werden, um ihren Inhalt gründlich zu mischen. Es ist darauf zu achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Gebrauch komplett aufgetaut ist.

   Hinweis: *Beim Umdrehen des Kalibrators und der Kontrollen ist starke Schaumbildung zu vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.*
2. Wenn der Röhrcheninhalt aufgetaut ist, trocknen Sie das Röhrchen außen mit einem sauberen, trockenen Einwegtuch ab.
3. Zur Verhinderung einer Kontamination sollten Sie die Röhrchen nicht öffnen.

C. Reagenzrekonstitution/Vorbereitung eines neuen Kits

Hinweis: *Die Reagenzrekonstitution sollte vor Beginn von Arbeiten mit dem Panther System durchgeführt werden.*

1. Gehen Sie folgenderweise vor, um das Target Capture-Reagenz (TCR) vorzubereiten:
   a. Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Überprüfen Sie die Chargennummer auf der TCR-Flasche, um sicherzustellen, dass sie mit der Chargennummer auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt übereinstimmt.
   b. Schütteln Sie die TCR-Flasche sofort kräftig 10 Mal. Lassen Sie die TCR-Flasche mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen. Während dieser Zeit sollten Sie das TCR-Fläschchen mindestens alle 10 Minuten schwenken und umdrehen.

      Option. Das TCR-Fläschchen kann auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung folgenderweise vorbereitet werden: Nehmen Sie das TCR aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C) und schütteln Sie es sofort kräftig 10 Mal. Platzieren Sie die TCR-

Flasche auf einer geeigneten Schwenkvorrichtung und lassen Sie sie mindestens 45 Minuten bei 15 °C bis 30 °C erwärmen.

c. Vergewissern Sie sich vor dem Gebrauch, dass alle Präzipitate in Lösung und die Magnetpartikel suspendiert sind.

2. Zum Rekonstituieren von Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenz gehen Sie folgenderweise auf:
   a. Nehmen Sie die gefriergetrockneten Reagenzien und die entsprechenden Rekonstitutionslösungen aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C). Paaren Sie jede Rekonstitutionslösung mit ihrem gefriergetrockneten Reagenz.
   b. Vergewissern Sie sich, dass das Etikett der Rekonstitutionslösung und das des gefriergetrockneten Reagenzes dieselbe Farbe aufweisen. Prüfen Sie die Chargennummern auf dem Hauptchargen-Barcodeblatt, um sicherzustellen, dass die richtigen Reagenzien miteinander gepaart wurden.
      i. Öffnen Sie das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz, indem Sie die Metallversiegelung und den Gummistopfen entfernen.
      ii. Führen Sie das gekerbte Ende des Rekonstitutionsverbindungsstücks (schwarz) fest in das Fläschchen ein (Abbildung 5, Schritt 1).
      iii. Öffnen Sie die Flasche mit der entsprechenden Rekonstitutionslösung und legen Sie die Kappe auf eine saubere, abgedeckte Arbeitsfläche.
      iv. Stellen Sie die Flasche mit der Rekonstitutionslösung auf eine stabile Fläche (d. h. den Labortisch). Drehen sich dann das Fläschchen mit dem gefriergetrockneten Reagenz über der Flasche mit der Rekonstitutionslösung um und befestigen Sie das Verbindungsstück an der Flasche mit Rekonstitutionslösung (Abbildung 5, Schritt 2).
      v. Drehen Sie die zusammengefügte Flaschen (an Flasche mit Lösung aufgesetztes Fläschchen) langsam um, damit die Lösung in das Glasfläschchen laufen kann (Abbildung 5, Schritt 3).
      vi. Schwenken Sie die zusammengefügten Flaschen mindestens 10 Sekunden lang (Abbildung 5, Schritt 4).
      vii. Warten Sie mindestens 30 Sekunden, damit das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gehen kann.
      viii. Nachdem das gefriergetrocknete Reagenz in Lösung gegangen ist, schwenken Sie die zusammengefügten Flaschen mindestens 10 Sekunden lang und mischen Sie anschließend die Lösung gründlich, indem Sie das Glasfläschchen leicht nach vorne und hinten kippen.
   c. Drehen Sie die zusammengefügten Flaschen dann wieder langsam um, damit die Lösung wieder komplett zurück in die Flasche mit der Rekonstitutionslösung fließen kann (Abbildung 5, Schritt 5).
   d. Nehmen Sie das Rekonstitutionsverbindungsstüc und das Glasfläschchen vorsichtig ab (Abbildung 5, Schritt 6) und entsorgen Sie sie (Abbildung 5, Schritt 8).
   e. Tragen Sie die Initialen des Bedieners und das Rekonstitutionsdatum auf dem Etikett ein. Laden Sie die Flaschen für den sofortigen Gebrauch auf den Reagenzienständer; andernfalls verschließen Sie die Flaschen und überführen Sie sie in die Lagerung (2 °C bis 8 °C) (Abbildung 5, Schritt 7).

Warnung: *Bei der Rekonstitution von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden. Schaum beeinträchtigt die Füllstandsmessung im Panther System.*

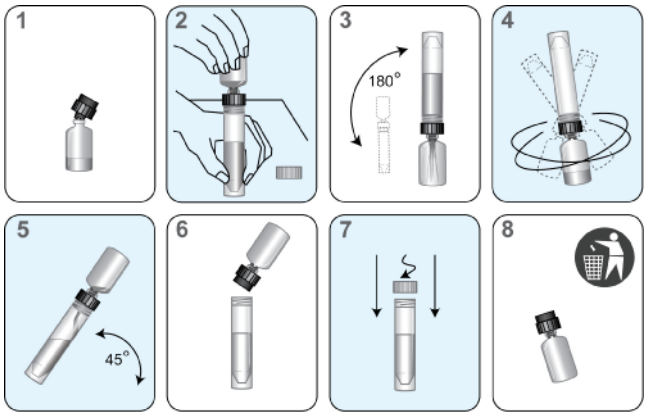

Abbildung 5. Rekonstitution von Reagenzien

D. Reagenzienvorbereitung für bereits vorbereitete Reagenzien

1. Nehmen Sie die bereits vorbereiteten Reagenzien aus der Lagerung (2 °C bis 8 °C).
2. Bereits vorbereitete Amplifikations-, Enzym-, Promotor- und TC-Reagenzien müssen vor Beginn des Assays auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C gebracht werden.
3. Bei bereits vorbereiteten TCR führen Sie vor dem Laden auf das System den Schritt C.1 oben durch.
4. Vor dem Laden auf das System müssen Amplifikations-, Enzym- und Promotorreagenzien zum gründlichen Mischen geschwenkt und umgedreht werden. Beim Umdrehen von Reagenzien übermäßige Schaumbildung vermeiden.
5. Füllen Sie Reagenzienflaschen nicht nach. Das Panther System erkennt Flaschen, die nachgefüllt wurden, und nimmt sie nicht an.

E. Probenhandhabung

1. Vergewissern Sie sich, dass gefrorene Patientenproben ganz aufgetaut sind. Mischen Sie die aufgetauten Patientenproben gründlich 3 bis 5 Sekunden auf dem Vortexer.
2. Bringen Sie die Patientenproben vor der Verarbeitung auf eine Temperatur von 15 °C bis 30 °C. Weitere Informationen über Proben auf dem Gerät siehe *Proben auf dem Panther System*.
3. Vergewissern Sie sich, dass jedes primäre Entnahmeröhrchen mindestens 1200 µl Patientenprobe enthält. Vergewissern Sie sich, dass jedes Probenaliquotröhrchen (Specimen Aliquot Tube, SAT) mindestens 700 µl Patientenprobe enthält. Falls eine Verdünnung der Patientenprobe erforderlich ist, siehe Schritt E.6 für weitere Informationen.
4. Mischen Sie die Patientenproben in SATs gründlich 3 bis 5 Sekunden auf dem Vortexer.
5. Zentrifugieren Sie jede Patientenprobe unmittelbar vor dem Laden in einen Probenständer 10 Minuten bei 1000 bis 3000*g*. Nehmen Sie nicht die Kappen ab. Luftbläschen im Röhrchen stören die Füllstandsmessung des Panther Systems.

   Für Informationen zum Laden des Ständers und zum Abnehmen der Kappen siehe *Vorbereitung des Systems*, Schritt F.2 nachstehend.

6. Verdünnen einer Plasmaprobe in einem SAT

   Eine Plasmaprobe kann für die Analyse auf dem Panther System in einem SAT verdünnt werden.

⚠ Wenn überhaupt, so ist eine Verdünnung von Plasmaproben nur für quantitative Ergebnisse erforderlich. Für diagnostische Ergebnisse dürfen Plasmaproben nicht verdünnt werden.

Hinweis: *Wenn eine Patientenprobe verdünnt wird, ist sie unmittelbar nach der Verdünnung zu testen.*

a. Verdünnung von Patientenproben, die in kleinen Volumen vorliegen

Das Volumen von Plasmaproben kann mit dem Aptima Probenverdünner auf das erforderliche Mindestvolumen (700 µl) erhöht werden. Patientenproben mit mindestens 240 µl Plasma können mit zwei Teilen Probenverdünner (1:3) folgenderweise verdünnt werden:

i. Geben Sie 240 µl Patientenprobe in ein SAT.

ii. Geben Sie 480 µl Probenverdünner hinzu.

iii. Verschließen Sie das Röhrchen.

iv. Drehen Sie es vorsichtig 5 Mal um, um den Inhalt zu mischen.

Patientenproben, die 1:3 verdünnt worden sind, können mit der 1:3-Option auf dem Panther System getestet werden (weitere Informationen finden Sie im *Panther System Operator's Manual* [Bedienungsanleitung für das Panther System]). Die Software gibt automatisch das Ergebnis für die unverdünnte Probe ab, indem sie den Verdünnungsfaktor anwendet. Solche Patientenproben werden als verdünnte Patientenproben gekennzeichnet.

b. Verdünnung hochtitriger Patientenproben

Liegt das Ergebnis einer Patientenprobe über dem oberen Quantifizierungsgrenzwert, kann sie mit 99 Teilen des Aptima Probenverdünners (1:100) folgenderweise verdünnt werden:

i. Geben Sie 30 µl Patientenprobe in ein SAT.

ii. Geben Sie 2970 µl Probenverdünner hinzu.

iii. Verschließen Sie das Röhrchen.

iv. Drehen Sie es vorsichtig 5 Mal um, um den Inhalt zu mischen.

v. Multiplizieren Sie das Ergebnis mit 100.

F. Vorbereitung des Systems

1. Richten Sie das System entsprechend den Anweisungen im *Panther System Operator's Manual* (Bedienungsanleitung für das Panther System) und den *Verfahrenshinweise* ein. Achten Sie darauf, Reagenzienständer und TCR-Adapter der geeigneten Größe zu verwenden.
2. Laden Sie Proben in den Probenständer. Führen Sie für jedes Probenröhrchen (Patientenproben und ggf. Kalibrator und Kontrollen) die folgenden Schritte durch:
   a. Lösen Sie die Kappe eines Probenröhrchens, aber nehmen Sie sie noch nicht ab.

      Hinweis: *Achten Sie besonders darauf, eine Kontamination durch Aerosolausbreitung zu vermeiden. Lösen Sie vorsichtig die Kappen der Proben.*

   b. Laden Sie das Probenröhrchen in den Probenständer.

   c. Wiederholen Sie Schritt 2.a und 2.b für jede verbleibende Probe.

   d. Wenn die Proben in den Probenständer geladen sind, nehmen Sie die Kappe von jedem Probenröhrchen ab und entsorgen Sie sie in einen Probenständer. Führen

Sie die Kappen zur Vermeidung von Kontamination nicht über einen Probenständer oder ein Probenröhrchen.

e. Verwenden Sie ggf. eine neue Einwegtransferpipette, um etwaige Luft- oder Schaumbläschen zum Platzen zu bringen.

f. Wenn die letzte Kappe abgenommen worden ist, fixieren Sie den Probenhalter, wenn gleichzeitig andere Assays und Probentypen analysiert werden, und laden Sie den Probenständer in ein Probenfach.

g. Wiederholen Sie Schritt 2.a bis 2.f für den nächsten Probenständer.

Verfahrenshinweise

A. Kalibrator

1. Der qHIV-1 Positivkalibrator kann in jede Position im Probenständer und in jede Probenfach-Bahn auf dem Panther System geladen werden. Die Pipettierung der Proben beginnt, wenn eine der folgenden beiden Bedingungen erfüllt ist:
   a. Der Kalibrator wird derzeit vom System verarbeitet.
   b. Ein gültiges Ergebnis für den Kalibrator ist im System gespeichert.
2. Sobald das Kalibratorröhrchen pipettiert worden ist und mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assayreagenzien-Kit verarbeitet wird, können bis zu 24 Stunden lang Patientenproben mit dem zugehörigen rekonstituierten Kit getestet werden, **es sei denn**:
   a. Das Kalibratorergebnis ist ungültig.
   b. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit wird aus dem System genommen.
   c. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit hat die Stabilitätsgrenze überschritten.
3. Das Kalibratorröhrchen kann einmal getestet werden. Wenn versucht wird, mehr als drei Replikate aus dem Röhrchen zu pipettieren, kann es zu Verarbeitungsfehlern kommen.

B. Kontrollen

1. Die Röhrchen mit der schwach positiven, der stark positiven und der negativen qHIV-1-Kontrolle können in jede Position im Probenständer und in jede Probenfach-Bahn auf dem Panther System geladen werden. Die Pipettierung der Proben beginnt, wenn eine der folgenden beiden Bedingungen erfüllt ist:
   a. Die Kontrollen werden derzeit vom System verarbeitet.
   b. Gültige Ergebnisse für die Kontrollen sind im System gespeichert.
2. Sobald die Röhrchen mit den Kontrollen pipettiert worden sind und mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Reagenzien-Kit verarbeitet werden, können bis zu 24 Stunden lang Patientenproben mit dem zugehörigen rekonstituierten Kit getestet werden, **es sei denn**:
   a. Die Kontrollenergebnisse sind ungültig.
   b. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit wird aus dem System genommen.
   c. Das zugehörige Assayreagenzien-Kit hat die Stabilitätsgrenze überschritten.
3. Jedes Kontrollröhrchen kann einmal getestet werden. Wenn versucht wird, mehr als einmal aus dem Röhrchen zu pipettieren, kann es zu Bearbeitungsfehlern kommen.

C. Handschuhpuder

Wie in jedem Reagenzsystem kann übermäßiger Puder auf manchen Handschuhen eine Kontamination geöffneter Röhrchen verursachen. Es werden ungepuderte Handschuhe empfohlen.

Qualitätskontrolle

Ein Lauf- oder Patientenprobenergebnis kann von einem Anwender für ungültig erklärt werden, wenn während der Durchführung des Assays technische, anwenderbezogene oder gerätebezogene Probleme auftreten und dokumentiert werden.

Assay-Kalibrierung

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss eine Assay-Kalibrierung durchgeführt werden. Ein einzelner Positivkalibrator wird (i) jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit auf das Panther System geladen wird, (ii) bei jedem neu rekonstituierten Reagenzien-Kit und (iii) alle 24 Stunden in Dreifachausführung analysiert. Der Anwender wird von Software auf dem Panther System darauf aufmerksam gemacht, wenn eine Kalibration erforderlich ist. Der Anwender scannt einen Kalibrierungskoeffizienten, der auf dem jedem Reagenzien-Kit beiliegenden Masterchargen-Barcodeblatt angegeben ist.

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme des Kalibrators von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Wenn weniger als zwei Kalibratorreplikate gültig sind, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

Negativ- und Positivkontrollen

Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss ein Satz von Assay-Kontrollen getestet werden. Ein Replikat der Negativkontrolle, der schwach positiven Kontrolle und der stark positiven Kontrollen muss jeweils (i) jedes Mal, wenn ein Reagenzien-Kit auf das Panther System geladen wird, (ii) bei jedem neu rekonstituierten Reagenzien-Kit und (iii) alle 24 Stunden getestet werden. Der Anwender wird von Software auf dem Panther System darauf aufmerksam gemacht, wenn Kontrollen erforderlich sind.

Während der Verarbeitung werden Kriterien für die Annahme der Kontrollen von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Zur Erzeugung gültiger Ergebnisse muss die Negativkontrolle ein Ergebnis „Keine HIV-1-RNA nachgewiesen“ liefern und die Ergebnisse der Positivkontrollen müssen innerhalb vordefinierter Parameter liegen. Wenn das Ergebnis für eine der Kontrollen ungültig ist, erklärt die Software den Lauf automatisch für ungültig. Proben eines für ungültig erklärten Laufs sind mit einem frisch vorbereiteten Kalibrator und frisch vorbereiteten Kontrollen erneut zu testen.

Interner Kalibrator/Interne Kontrolle

Jede Probe enthält einen internen Kalibrator/eine interne Kontrolle (IC). Während der Verarbeitung werden IC-Annahmekriterien von der Software auf dem Panther System automatisch verifiziert. Wenn das IC-Ergebnis ungültig ist, wird das Probenergebnis für ungültig erklärt. Jede Probe mit ungültigem IC-Ergebnis muss erneut getestet werden, um ein gültiges Ergebnis zu erhalten.

Testauswertung

Hinweis: *Unter Verwendung von Plasma wurden die quantitativen Ergebnisse des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays evaluiert. Serum kann für quantitative Ergebnisse nicht verwendet werden. Qualitative Ergebnisse wurden sowohl mit Plasma als auch mit Serum evaluiert.*

Ergebnisse

Das Panther System bestimmt die Konzentration der HIV-1-RNA in Patientenproben und Kontrolle automatisch, indem es die Ergebnisse mit einer Kalibrationskurve vergleicht. HIV-1-RNA-Konzentrationen werden in Kopien/ml und log_{10} Kopien/ml angegeben. In Tabelle 1 ist die Ergebnisauswertung gezeigt. Wenn für 1:3 verdünnte Patientenproben die 1:3-Option verwendet wird, berechnet das Panther System automatisch die HIV-1-Konzentration der unverdünnten Patientenprobe, indem es die Konzentrationsergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Hinweis: *Bei verdünnten Patientenproben können Ergebnisse wie „Nicht nachgewiesen“ oder „<30 nachgewiesen“ erhalten werden, indem eine Patientenprobe mit einer Konzentration knapp über der LOD bzw. LLOQ verdünnt wird. Es wird empfohlen, eine andere unverdünnte Patientenprobe zu entnehmen und zu testen, wenn kein quantitatives Ergebnis erhalten wird.*

Das Panther System liefert kein qualitatives Ergebnis (d. h. „Reaktiv“ oder „Nicht-reaktiv“ für die diagnostische Anwendung. Der Anwender muss die angegebene HIV-1-RNA-Konzentration selbst zu einem qualitativen Ergebnis interpretieren (Tabelle 1). Patientenproben mit einem Ergebnis „Nicht nachgewiesen“ sind nicht-reaktiv auf HIV-1-RNA. Patientenproben mit einem Ergebnis „<30 nachgewiesen“ oder Patientenproben mit Ergebnissen innerhalb des linearen Bereichs bedeuten, dass HIV-1-RNA nachgewiesen wurde und dass diese Patientenproben auf HIV-1-RNA reaktiv sind.

Tabelle 1: Ergebnisauswertung

Angegebenes Aptima HIV-1 Quant Dx-Ergebnis[a]		Auswertung der HIV-1-RNA-Konzentration[a]	Diagnostische qualitative Auswertung des Anwenders[c]
Kopien/ml[b]	Log_{10} Wert		
Nicht nachgewiesen	Nicht nachgewiesen	Keine HIV-1-RNA festgestellt.	Nicht reaktiv auf HIV-1-RNA.
<30 nachgewiesen	<1,47	Es wird HIV-1-RNA nachgewiesen, aber in einer Menge unter der unteren Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLOQ).	Reaktiv auf HIV-1-RNA.
30 bis 10.000.000	1,47 bis 7,00	Die HIV-1-RNA-Konzentration liegt im linearen Bereich von 30 bis 10.000.000 Kopien/ml.	Reaktiv auf HIV-1-RNA.
>10.000.000	>7,00	Die HIV-1-RNA-Konzentration liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze (Upper Limit of Quantitation, ULOQ).	Reaktiv auf HIV-1-RNA.
Ungültig	Ungültig	Es gab einen Fehler bei der Erzeugung des Ergebnisses. Die Patientenprobe sollte noch einmal getestet werden.	Ungültig.[d]

[a] Die Leistung des Assays hinsichtlich der Quantifizierung von HIV-1-RNA in Serumproben wurde nicht ermittelt. Für Serumproben keine quantitativen HIV-1-RNA-Ergebnisse angeben.

[b] Der Faktor zum Umrechnen von Kopien in internationale Einheiten (IE) für den 3. Internationalen Standard für HIV-1-RNA (10/152) lautet 0,35 Kopien/IE.

[c] Eine diagnostische Auswertung kann ausgehend von unverdünnten Serum- oder Plasmaproben erfolgen.

Hinweis: *Bei verdünnten Patientenproben können Ergebnisse wie „Nicht nachgewiesen“ oder „<30 nachgewiesen“ erhalten werden, indem eine Patientenprobe mit einer Konzentration knapp über der LOD/LLOQ verdünnt wird. Es wird empfohlen, eine andere unverdünnte Patientenprobe zu entnehmen und zu testen, wenn kein quantitatives Ergebnis erhalten wird.*

[d] Ungültige Ergebnisse sind in blauer Schrift angezeigt.

Einschränkungen

A. Dieser Test darf nur von Mitarbeitern durchgeführt werden, die im Verfahren unterwiesen wurden. Eine Nichtbefolgung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann fehlerhafte Ergebnisse zur Folge haben.

B. Zuverlässige Ergebnisse hängen von der Adäquanz der Entnahme, des Transports, der Lagerung und der Verarbeitung der Patientenproben ab.

C. Dieser Assay wurde nur mit Humanplasma zur Verwendung als quantitativer Assay validiert.

D. Dieser Assay wurde mit Humanplasma und Humanserum zur Verwendung als qualitativer Assay validiert.

E. Eine Kontamination kann nur durch Einhaltung der guten Laborpraxis und der in der vorliegenden Packungsbeilage angegebenen Vorgehensweise vermieden werden.

F. Es besteht die seltene Möglichkeit, dass Mutationen in den hoch konservierten Regionen des Virusgenoms, in denen die Primer und/oder Sonden im Aptima HIV-1 Quant Dx Assay binden, zu einer zu niedrigen Quantifizierung oder zu einem nicht erfolgten Nachweis des Virus führen.

Leistung

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist definiert als die HIV-1-RNA-Konzentration, die gemäß CLSI EP17-A2 (37) mit einer Wahrscheinlichkeit vom mindestens 95% festgestellt wird. Die LOD wurde durch Testung von Panels bestimmt, die aus Verdünnungen des 3. Internationalen HIV-1-Standards der WHO (Subtyp B, NIBSC-Code: 10/152) in HIV-1-negativem Plasma bestanden. Es wurden 30 Replikate jeder Verdünnung auf drei Panther Systemen mit drei Reagenzchargen analysiert, d. h. insgesamt 90 Replikate pro Verdünnung. Gemäß CLSI EP17-A2 sind die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration für die vorhergesagte Nachweisgrenze als LOD definiert und in Tabelle 2 gezeigt. Die LOD für den Aptima HIV-1 Quant Dx Assay beträgt per Probit-Analyse 13 Kopien/ml (37 IE/ml; 0,35 Kopien = 1 IE).

Tabelle 2: Nachweisgrenze des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays bei Verwendung des 3. internationalen HIV-1-Standards der WHO

Vorhergesagte Nachweisgrenze	Konzentration (Kopien/ml)
10%	1,3
20%	1,8
30%	2,3
40%	2,7
50%	3,2
60%	3,9
70%	4,9
80%	6,5
90%	9,5
95%	13,1

Nachweisgrenze bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen

Für die HIV-1-Gruppe M (Subtyp A, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) und die Gruppen N und O wurden sieben Panels hergestellt, indem HIV-1-negatives Humanplasma entweder mit einer HIV-1-Viruskultur oder positiven klinischen Patientenproben versetzt wurde (0 bis 40 Kopien/ml). Jede Panelprobe wurde in 30 Replikaten mit zwei Reagenzchargen getestet, d. h. insgesamt 60 Replikate pro Panelprobe. Die Zuweisung der Konzentration zu klinischen Patientenproben oder Viruskultur-Stammlösungen wurde mit einem Vergleichsassay bestimmt. Zur Aufstellung der vorhergesagten 50-%- und 95-%-Nachweisgrenzen wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Gemäß CLSI EP17-A2 (37) sind die Ergebnisse der Reagenzcharge mit der höchsten Konzentration für die vorhergesagte Nachweisgrenze als LOD definiert und in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Nachweisgrenze bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen

Subtyp/Gruppe	Vorhergesagte Nachweisgrenze	Konzentration (Kopien/ml)
A	50%	3,0
	95%	12,3
CRF01_AE	50%	1,8
	95%	7,6
CRF02_AG	50%	3,4
	95%	15,4
C	50%	2,2
	95%	11,8
D	50%	4,2
	95%	14,8
F	50%	2,0
	95%	8,3
G	50%	3,5
	95%	18,2
N	50%	1,3
	95%	7,9
O	50%	2,0
	95%	8,0

Linearer Bereich

Der lineare Bereich des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays wurde durch Testung von Panels bestimmt, die aus einer nach CLSI EP06-A (38) in HIV-1-negativem Humanplasma verdünnten HIV-1-Subtyp-B-Viruskultur bestanden. Die Konzentration der Panels lag im Bereich von 1,30 bis 7,30 log Kopien/ml. Die Tests erfolgten auf sieben Panther Systemen mit zwei Reagenzchargen des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays. Wie in Abbildung 6 gezeigt, erwies sich der Aptima Quant Dx Assay im gesamten Testbereich als linear.

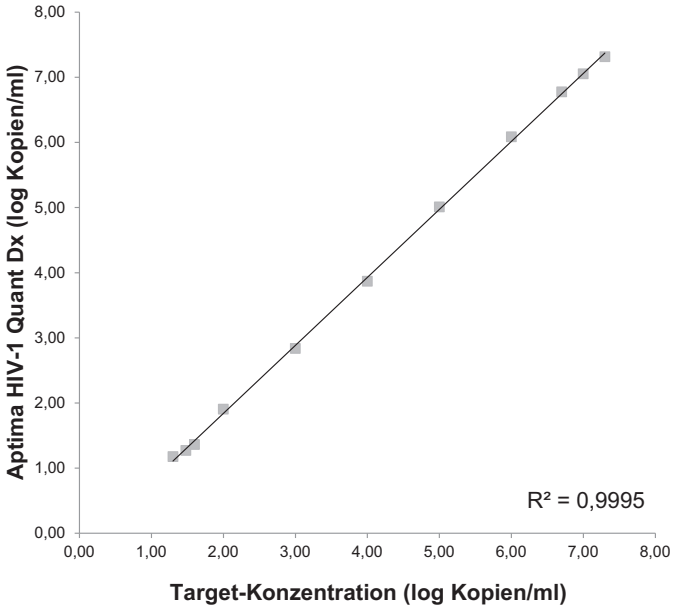

Abbildung 6. Linearität des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays

Linearität bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen

Die lineare Reaktion des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays in Gruppe M (Subtyp A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) und in den Gruppen N und O wurde durch Testung von pufferverdünnten HIV-1-Transkript-Panels im Konzentrationsbereich von 2,00 bis 6,50 log Kopien/ml bestätigt. Die Tests erfolgten auf vier Panther Systemen in sechs Läufen. Im gesamten Testbereich wurde Linearität aufgezeigt (Abbildung 7).

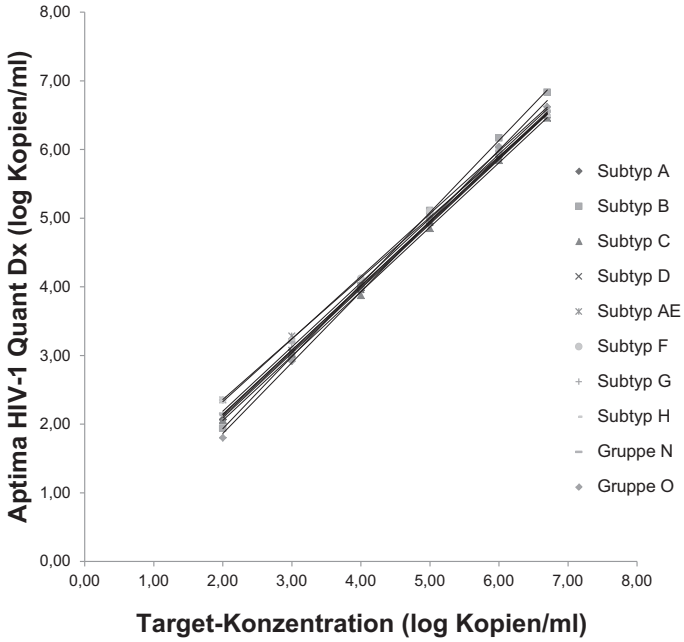

Abbildung 7. Linearität in Gruppe M (Subtyp A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE) und in den Gruppen N und O

Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze mithilfe des 3. internationalen WHO-Standards

Die untere Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantitation, LLOQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der HIV-1-RNA innerhalb eines Gesamtfehlers (Total Error, TE) zuverlässig gemäß CLSI EP17-A2 (37) quantifiziert werden kann. Der TE wurde mit dem Westgard-Modell berechnet (TE = Bias + 2 SA). Zur Sicherstellung der Genauigkeit und Präzision der Messungen wurde der TE des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays auf 1 log Kopien/ml festgesetzt (d. h., an der LLOQ ist der Unterschied zwischen zwei Messungen von mehr als 1 log Kopien/ml statistisch signifikant).

Die LLOQ wurde durch Testung von Panels bestimmt, die aus Verdünnungen des 3. internationalen HIV-1-WHO-Standards (Subtyp B, NIBSC-Code: 10/152) in HIV-1-negativem Plasma bestanden. Gemäß CLSI EP17-A2 wurden die Panels mit drei Reagenzchargen in Replikaten von je 30 pro Charge in 26 Läufen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt. Die höchste LLOQ für die drei auf dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay mit dem 3. internationalen WHO-Standard gemessenen Chargen beträgt 19 Kopies/ml (1,27 log Kopien/ml) (Tabelle 5).

Tabelle 4: Bestimmung der LLOQ des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays mit dem 3. internationalen HIV-1-Standard der WHO

Reagenz-charge	Target-Konzentration (log Kopien/ml)	Aptima HIV-1 Quant Dx (log Kopien/ml)	SA (log Kopien/ml)	Bias (log Kopien/ml)	Berechneter TE (log Kopien/ml)
1	1,15	0,97	0,36	0,18	0,90
	1,24	0,86	0,34	0,39	1,06
	1,42	1,27	0,35	0,15	0,85
	1,54	1,36	0,23	0,19	0,64
	1,94	1,90	0,15	0,05	0,34
	2,42	2,40	0,08	0,01	0,18
2	1,15	0,49	0,30	0,65	1,26
	1,24	0,73	0,41	0,51	1,33
	1,42	0,88	0,38	0,54	1,30
	1,54	1,20	0,25	0,34	0,84
	1,94	1,74	0,22	0,21	0,64
	2,42	2,30	0,19	0,12	0,50
3	1,15	0,86	0,40	0,29	1,09
	1,24	0,95	0,37	0,29	1,03
	1,42	1,10	0,33	0,32	0,98
	1,54	1,27	0,36	0,27	0,99
	1,94	1,79	0,18	0,15	0,51
	2,42	2,35	0,12	0,07	0,31

Tabelle 5: Aufstellung von LLOQ mit dem 3. internationalen HIV-1-Standard der WHO (3 Reagenzchargen)

Reagenzcharge	LLOQ (log Kopien/ml)	LLOQ (log Kopien/ml)
1	1,27	19
2	1,20	16
3	1,10	13

Verifizierung der LLOQ bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen

Die LLOQ bei HIV-1-Subtypen und -Gruppen wurde gemäß CLSI EP17-A2 (37) verifiziert. Für jede HIV-1-Gruppe M (Subtyp A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG) und die Gruppen N und O wurden Panels hergestellt, indem gepooltes HIV-1-negatives Humanplasma entweder mit natürlich infizierten klinischen Proben oder klinischen Isolaten versetzt wurde. Die Tests bestanden aus insgesamt 30 Replikaten pro Panelprobe. Die Daten in Tabelle 6 zeigen die niedrigste Konzentration für jeden Subtyp bzw. jede Gruppe, bei dem bzw. der der TE unter 1 log Kopien/ml bestand. Die höchste LLOQ für alle getesteten Subtypen und Gruppen betrug 30 Kopien/ml; daher wurde dieser höhere Wert als LLOQ für den Aptima HIV-1 Quant Dx Assay gewählt.

Tabelle 6: Verifizierung des LLOQ nach HIV-1-Subtyp oder -Gruppe

Panel	LLOQ (log Kopien/ml)
Subtyp A	30
Subtyp CRF01_AE	10
Subtyp CRF02_AG	30
Subtyp B	15
Subtyp C	30
Subtyp D	20
Subtyp F	15
Subtyp G	30
Gruppe N	10
Gruppe O	15

Präzision

Zur Beurteilung der Präzision des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays wurde ein Panel aus mit HIV-1-Subtyp-B-Viruskultur versetztem HIV-1-negativem Plasma von drei Anwendern mit drei Reagenzchargen auf drei Panther Systemen in einem Zeitraum von 20 Tagen getestet (Tabelle 7). Das Panel bestand aus einer HIV-1-negativen Panelprobe und acht HIV-1-

positiven Panelproben. Die Zuweisung der Konzentration zu klinischen Patientenproben oder Viruskultur-Stammlösungen wurde mit einem Vergleichsassay bestimmt.

Tabelle 7: Präzision des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays

Anzahl der gültigen Replikate	Mittlere Konzentration (log Kopien/ml)	Zwischen Geräten		Zwischen Bedienern		Zwischen Chargen		Zwischen Durchläufen		Innerhalb von Durchläufen		Gesamt	
		SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)	SD	VK (%)
132	1,74	0,00	0,00	0,03	1,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	9,08	0,16	9,25
157	2,32	0,00	0,00	0,05	2,17	0,02	0,91	0,09	3,75	0,15	6,57	0,18	7,92
158	2,42*	0,00	0,00	0,02	0,61	0,05	1,93	0,07	2,81	0,13	5,31	0,15	6,34
162	2,92	0,02	0,53	0,08	2,58	0,04	1,28	0,09	3,23	0,09	3,02	0,16	5,30
162	3,80	0,02	0,57	0,04	0,93	0,05	1,29	0,05	1,38	0,08	2,10	0,12	3,03
159	4,99	0,01	0,19	0,03	0,51	0,05	0,94	0,05	1,09	0,04	0,79	0,09	1,73
162	5,73	0,00	0,00	0,02	0,38	0,04	0,78	0,04	0,65	0,07	1,28	0,10	1,67
161	6,75	0,00	0,00	0,02	0,26	0,04	0,62	0,04	0,54	0,05	0,80	0,08	1,17

Die Variabilität aufgrund von manchen Faktoren kann numerisch negativ sein, und zwar dann, wenn die Variabilität aufgrund dieser Faktoren sehr klein ist. In diesem Fall gilt SA = 0 und VK = 0%. Pro Panel wurden insgesamt 162 Replikate getestet; es wurden nur Replikate mit numerischem Wert analysiert.

*Diese Panelprobe wurde 1:3 mit Probenverdünner verdünnt und zur Evaluierung der Präzision mit der verdünnten Probe getestet.

Stoffe mit möglicher beeinträchtigender Wirkung

Es wurde die Anfälligkeit des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays gegenüber Interferenzen durch erhöhte Konzentrationen endogener Stoffe und von Wirkstoffen, die HIV-1-Infizierten häufig verordnet werden, evaluiert. Es wurden HIV-1-negative Plasmaproben und Proben verwendet, die bis zu einer Konzentration von 3 log Kopien/ml mit HIV-1-RNA versetzt worden waren.

Bei Vorhandensein von Albumin (90 mg/ml), Hämoglobin (5 mg/ml), Triglyzeriden (30 mg/ml) oder unkonjugiertem Bilirubin (0,2 mg/ml) wurde keine Interferenz der Leistung des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays festgestellt.

Bei Vorhandensein der in Tabelle 8 gelisteten exogenen Stoffe in Konzentrationen vom mindestens Dreifachen der C_{max} (Humanplasma) wurde keine Interferenz der Leistung des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays festgestellt.

Tabelle 8: Exogene Stoffe

Pool von exogenen Stoffen	Getestete exogene Stoffe
1	Lopinavir, Indinavir, Saquinavir, Ritonavir, Nelfinavirmesylat, Darunavir, Amprenavir, Atazanavir
2	Nevirapin, Efavirenz, Rilpivirin, Clarithromycin, Amphotericin B
3	Tenofovir-Disoproxilfumarat, Adefovirdipivoxil, Ribavirin, Enfuvirtid, Maraviroc, Raltegravir, Dolutegravir
4	Abacavirsulfat, Didanosin, Zidovudin, Lamivudin, Stavudin, Entecavir, Telbivudine, Emtricitabin
5	Paroxetin-HCl, Fluoxetin, Sertralin
6	Ganciclovir, Valacyclovir, Acyclovir, Rifampin/Rifampicin, Ethambutol
7	Ciprofloxacin, Azithromycin, Amoxicillin, Cephalexin, Ampicillin, Trimethoprim
8	Valganciclovirhydrochlorid, Boceprevir, Telaprevir, Simeprevir, Sofosbuvir
9	PegInterferon alpha -2b, Interferon alpha -2a, Interferon alpha -2b
10	Heparin, EDTA, Natriumcitrat
11	Tipranavir
12	Isoniazid

Die in Tabelle 9 gelisteten klinischen Plasmaproben von Patienten mit erhöhten Konzentrationen definierter Stoffe oder von Patienten mit den gelisteten Krankheiten wurden mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay mit oder ohne 3 log Kopien von HIV-1-RNA getestet. Es wurde keine Interferenz der Leistung beobachtet.

Tabelle 9: Getestete Typen klinischer Patientenproben

	Typen klinischer Patientenproben
1	Rheumafaktor (RF)
2	Anti-Kern-Antikörper (ANA)
3	Anti-Jo-1-Antikörper (JO-1)
4	Systemischer Lupus eryth. (SLE)
5	Rheumatoide Arthritis (RA)
6	Multiple Sklerose (MS)
7	Hyperglobulinämie (IgG oder IgM ist akzeptabel)
8	Erhöhte Alaninaminotransferase (ALT)
9	Alkoholbedingte Zirrhose (AC)
10	Multiples Myelom (MM)
11	Lipämisch (erhöhte Lipide)
12	Ikterisch (erhöhtes Bilirubin)
13	Hämolysiert (erhöhtes Hämoglobin)
14	Erhöhtes Proteinalbumin
15	HCV-Antikörper
16	HBV-Antikörper
17	HIV-2-Antikörper

Spezifität

Die Spezifität des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays wurde mithilfe von 120 frischen und 510 gefrorenen HIV-1-negativen Plasmaproben und mithilfe von 120 frischen und 510 gefrorenen HIV-1-negativen Serumproben. Alle Ergebnisse waren nicht-reaktiv (Spezifität 100%; 95%-KI: 99,4-100%).

Tabelle 10: Serum- und Plasmaspezifität

	Frisches Plasma	Gefrorenes Plasma	Gesamt-plasma	Frisches Serum	Gefrorenes Serum	Gesamt-serum
Gültige Replikate (n)	120	510	630	120	510	630
Nicht-reaktiv	120	510	630	120	510	630
Spezifität % (95%-KI)	100% (97,0-100)	100% (99,3-100)	100% (99,4-100)	100% (97,0-100)	100% (99,3-100)	100% (99,4-100)

Analytische Spezifität

Die mögliche Kreuzreaktivität auf Erreger (Tabelle 11) im Aptima HIV-1 Quant Dx Assay wurde mit oder ohne 3 log Kopien von HIV-1-RNA in HIV-1-negativem Plasma evaluiert. Bei Gegenwart der Erreger wurde keine Interferenz der Leistung des Assays festgestellt.

Tabelle 11: Zur Ermittlung der Analysespezifität getestete Erreger

Erreger	Konzentration
Hepatitis A	100.000 PBE/ml[1]
Hepatitis B	100.000 IE/ml[2]
Hepatitis C	100.000 IE/ml
Hepatitis G	100.000 Kopien/ml
Herpes-Simplex-Virus 1	100.000 PBE/ml
Herpes-Simplex-Virus 2	75.000 PBE/ml
Humanes Herpesvirus 6	100.000 Kopien/ml
Humanes Herpesvirus 8	42.000 PBE/ml
HIV-2	5.500 PBE/ml
HTLV	100.000 vp/ml[3]
West Nil-Virus	100.000 Kopien/ml
Parvo B19	100.000 IE/ml
Zytomegalievirus	100.000 Kopien/ml
Epstein-Barr-Virus	100.000 Kopien/ml
Adenovirus Typ 5	100.000 PBE/ml
Dengue	100.000 Kopien/ml
Influenza A	100.000 PBE/ml
Staphylococcus aureus	1.000.000 KBE/ml[4]
Propionibacterium acnes	1.000.000 KBE/ml
Staphylococcus epidermis	1.000.000 KBE/ml
Neisseria gonorrhoeae	1.000.000 KBE/ml
Chlamydia trachomatis	300.000 IFU/ml[5]
Candida albicans	1.000.000 KBE/ml

[1]PBE/ml = Plaque-bildende Einheiten pro ml.
[2]IE/ml = Internationale Einheiten pro ml.
[3]vp/ml = Viruspartikel pro ml.
[4]KBE/ml = Kolonie-bildende Einheiten pro ml.
[5]IFU/ml = Einschlusskörper-bildende Einheiten pro ml.

Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben

Es wurden zehn klinische Plasmaproben in drei Replikaten mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay getestet. Die Durchschnittskonzentration und die Standardabweichungen sind in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Wiederholbarkeit bei klinischen Patientenproben

Patienten-probe	Durchschnitts-konzentration (log Kopien/ml)	SD
1	2,51	0,08
2	3,14	0,02
3	3,17	0,02
4	3,95	0,03
5	4,20	0,06
6	4,94	0,02
7	5,19	0,08
8	5,55	0,03
9	5,86	0,02
10	6,67	0,01

Probenverdünnung mit Probenverdünner

Zur Beurteilung der Probenverdünnung wurde ein Panel aus 11 Proben mit Konzentrationen im linearen Bereich des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays, inkl. zwei Proben über der oberen Quantifizierungsgrenze des Assays, unverdünnt und verdünnt (1:3 oder 1:100 in Probenverdünner) in dreifacher Ausführung (Tabelle 13), getestet.

Tabelle 13: Probenverdünnung

Verdünnungsfaktor	Durchschnittskonzentration, unverdünnt (log Kopien/ml)	Durchschnittskonzentration, angegeben[a] (log Kopien/ml)	Unterschied
	2,51	2,65	0,14
	3,14	3,31	0,17
	3,17	3,51	0,34
	3,95	4,02	0,07
	4,20	4,21	0,01
1:3	4,94	4,81	0,13
	5,19	5,11	0,08
	5,55	5,38	0,17
	5,86	5,99	0,13
	6,67	6,66	0,01
	2,39[b]	2,17[c]	0,22
1:100	>7,00 (7,13)	7,51	0,38
1:100	>7,00 (7,46)[b]	7,45	0,01

[a]Die angegebene Konzentration ist der nach Anwendung des Verdünnungsfaktors berechnete Wert.

[b]Versetzte Patientenprobe.

[c] Ergebnis von zwei von drei getesteten Replikaten. Ein angegebenes Replikatergebnis war nicht-numerisch („<30 nachgewiesen“).

Hinweis: Alle Ergebnisse > 7,00 log Kopien/ml wurden in einer weiteren Analyse geschätzt.

Methodenkorrelation

Die Leistung des Aptima HIV-1 Quant Dx Assays wurde mit dem eines anderen Assays mit CE-Kennzeichnung verglichen, indem unverdünnte klinische Plasmaproben von HIV-1-Infizierten auf vier Panther Systemen mit zwei Reagenzchargen getestet wurden. Für die lineare Regression wurden insgesamt 340 gefrorene und 103 frische Plasmaproben mit quantifizierbaren Ergebnissen sowohl im Aptima HIV-1 Quant Dx Assay als auch im Vergleichsassay verwendet (Abbildung 8). Die Proben beinhalteten die HIV-1-Gruppe M (Subtyp A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG).

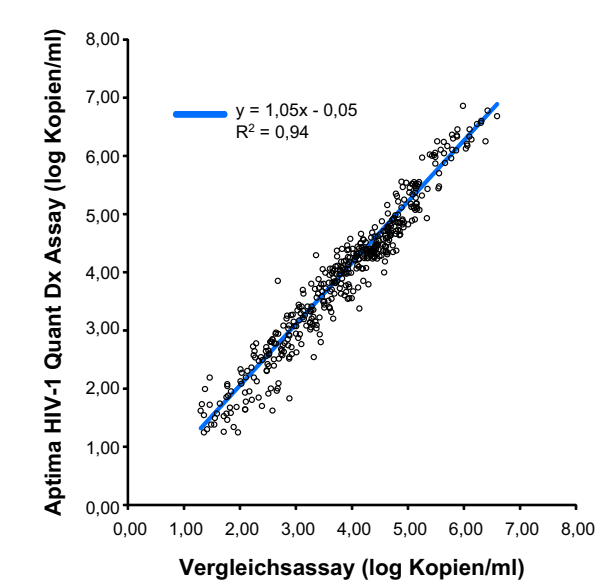

Abbildung 8. Korrelation zwischen dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay und einem Vergleichsassay

Diagnostische Übereinstimmung

Zur Beurteilung der diagnostischen Übereinstimmung wurden Patientenproben von HIV-1-positiven Personen mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay und einem qualitativen HIV-1-Vergleichsassay mit CE-Kennzeichnung getestet: 413 Patientenproben lieferten gültige Ergebnisse (Tabelle 14). Die Ergebnisse beider Assays wurden folgenderweise kategorisiert. Jedes quantifizierbare oder nachweisbare Ergebnis wurde als „Nachgewiesen“ kategorisiert. Jedes Ergebnis mit nicht nachgewiesenem Target wurde als „Target nicht nachgewiesen“ kategorisiert.

Tabelle 14: Diagnostische Übereinstimmung zwischen dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay und einem Vergleichsassay

		Aptima HIV-1 Quant Dx Assay	
		Nachgewiesen	**Target nicht nachgewiesen**
Vergleichsassay	**Nachgewiesen**	213	0
	Target nicht nachgewiesen	0	200

Verschleppung

Um festzustellen, ob das Panther System das Risiko falschpositiver Ergebnisse infolge einer verschleppungsbedingten Kontamination minimiert, wurde eine Analysestudie mit mehreren Läufen durchgeführt, bei der versetzte Panels auf zwei Panther Systemen getestet wurden. Die Beurteilung der Verschleppung erfolgte anhand von hochtitrigen, mit HIV-1 versetzten Proben (7 log Kopien/ml), die im Schachbrettmuster zwischen HIV-1-negativen Proben verteilt waren. Zur Testung wurden fünf Läufe durchgeführt. Die Gesamtverschleppungsrate betrug 0% (n=470).

Serokonversionspanel

Es wurden 19 HIV-1-Serokonversionspanelsets aus 204 Proben mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay getestet. Der Nachweis von HIV-1-RNA wurde mit dem Nachweis in p24-Antigentests und in HIV-1/2-Antikörpertests verglichen. Die Anzahl der Tage bis zum ersten

reaktiven Ergebnis bei p24-Antigentests, Anti-HIV-1/2-Antikörpertests und im Aptima HIV-1 Quant Dx Assay ist in Tabelle 15 gelistet. Der Aptima HIV-1 Quant Dx Assay wies HIV-1-RNA durchschnittlich 5,58 und 10,89 Tage vor dem p24-Antigentest bzw. dem Anti-HIV-1/2-Antikörpertest nach.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Daten mit dem Serokonversionspanel

Panel-ID	Anzahl der getesteten Panelproben	Anzahl der reaktiven Panelproben			Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis			Unterschied bzgl. der Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis (ausgehend vom Datum der Blutentnahme)	
		Aptima HIV-1 Quant Dx	HIV-p24-Antigen-Test	Anti-HIV 1/2-Antikörper-Test	Aptima HIV-1 Quant Dx	HIV-p24-Antigen-Test	Anti-HIV 1/2-Antikörper-Test	Nachweis um x Tage früher als mit dem HIV-p24-Antigen-Test	Nachweis um x Tage früher als mit dem Anti-HIV 1/2-Antikörper-Test
6248	7	3	2	1	14	18	25	4	11
6243	10	6	3	2	18	25	32	7	14
6247	9	4	4	1	21	21	30	0	9
9016	10	3	2	0	27	30	34**	3	7
9018	11	5	3	2	21	28	32	7	11
9020	22	5	4	1	83	87	97	4	14
9021	17	5	4	1	43	47	57	4	14
9022	9	3	2	1	23	25	32	2	9
9023	22	5	3	0	71	78	85**	7	9
9030	16	5	3	1	40	47	54	7	14
9034	13	4	3	1	41	46	53	5	12
9089	6	5	3	2	7	16	20	9	13
12008	13	7	4	4	21	28	33	7	12
PRB962	6	4	2	0	7	14	17**	7	10
PRB963	7	4	2	0	9	17	21**	8	12
PRB966	10	5	3	2	35	44	48	9	13
PRB974*	4	3	2	1	7	9	16	2	9
PRB975*	5	3	1	0	7	14	14**	7	7
PRB978*	7	3	1	0	26	33	33**	7	7
Gesamt	**204**	**82**	**51**	**20**			**Mittel**	**5,58**	**10,89**
							Median	**7**	**11**

Die Tests auf Anti-HIV 1/2-Antikörper wurden mit dem Anti-HIV-1/2-Test von Abbott durchgeführt, mit folgenden Ausnahmen:
*Die Panels PRB974, PRB975 und PRB978 wurden mit dem Anti-HIV 1/2-Test von Siemens getestet.
Die Tests auf HIV-1-p24-Antigen wurden mit dem HIV-1 p24 Ag-Test von Coulter durchgeführt, mit folgenden Ausnahmen:
*Die Panels PRB974, PRB975 und PRB978 wurden mit dem p24 Ag-Test von BioMerieux getestet.
**Alle Blutproben in diesem Panel waren im Anti-HIV-1/2-Antikörper-Test nicht-reaktiv. Als Basis für die „Tage bis zum ersten reaktiven Ergebnis“ wurde der letzte Blutentnahmetag verwendet.

Serum, Plasmaäquivalenz-Studie

Zur Beurteilung der Äquivalenz wurden Serum- und Plasmapaare (25 HIV-1-positiv und 25 HIV-1-negativ) und 40 Proben, die mit HIV-1-Kultur (50-1.000.000 Kopien/ml in HIV-1-negativem Plasma und Serum) versetzt worden waren, mit dem Aptima HIV-1 Quant Dx Assay getestet. Die negative Übereinstimmung betrug 100,0% (95%-KI: 96,6%-100,0%). Die positive Übereinstimmung betrug 98,4% (95%-KI: 95,4%-99,5%).

Bibliographie

1. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouziuuz, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Science **220**:868–871.
2. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo**. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science **224**:497–500.
3. **Gallo R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Strearer, M. Kaplan, D. F. Haynas, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and P. D. Markham.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science **224**:500–503.
4. **Piot, P., F. A. Plummer, F. S. Mhalu, J-L. Lamboray, J. Chin, and J. M. Mann.** 1988. AIDS: An international perspective. Science **239**:573–579.
5. **Sarngadharan, J. G., M. Popovic, L. Broch, J. Scupbach, and R. C. Gallo.** 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science **224**:506–508.
6. **Gallo, D., J. S. Kimpton, and P. J. Dailey**. 1987. Comparative studies on use of fresh and frozen peripheral blood lymphocyte specimens for isolation of human immunodeficiency virus and effects of cell lysis on isolation efficiency. J. Clin. Microbiol. **25**:1291–1294.
7. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. Rey, M. O. Santos-Ferraira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science **233**:343–346.
8. **Curran, J. W., H. W.Jaffe, A. M. Hardy, W. M. Morgan, R. M. Selik, and T. J. Dondero.** 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. Science **239**:610–616.
9. **Gaines, H., M. A. von Sydow, and L.V. von Stedingk.** 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. AIDS **4**:995–999.
10. **Tindall, B., and D. A. Cooper.** 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. AIDS **5**:1–14.
11. **Daar, E. S., T. Moudgil, R. D. Meyer, and D. D. Ho.** 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. N. Engl. J. Med. **324**:961–964.
12. **Clark, S. J., M. S. Saag, and W. D. Decker.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. N. Engl. J. Medicine **324**:954–960.
13. **Albert J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nystrom, and E. M. Fenyo.** 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. AIDS **4**:107–112.
14. **Horsburgh, C. R. Jr., C. Y. Ou, J. Jason, S. D. Holmberg, I. M. Longini Jr., C. Schable, K. H. Mayer, A. R. Lifson, G. Schochetman, J. W. Ward, et al.** 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. Lancet **16**:637–640.
15. **Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, H. C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C. H. Fox, N. P. Salzman, and A. S Fauci.** 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. Science **245**:305–308. Erratum in: Science 1989 **245**, preceding 694.
16. **Schnittman, S. M., J. J.Greenhouse, M. C. Psallidopoulos, M. Baseler, N. P. Salzman, A. S Fauci, and H.C. Lane.** 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. Ann. Intern. Med. **113**:438–443.
17. **Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci.** 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. N. Engl. J. Med. **328**:327–335.
18. **Piatak, M. Jr., M. S. Saag, L. C. Yang, S. J. Clark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and J. D. Lifson.** 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. Science **259**:1749–1754.
19. **Fauci, A . S., S. M. Schnittman, G. Poli, S. Koenig, and G. Pantaleo.** 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann. Intern. Med. **114**:678–693.
20. **Coffin, J. M.** 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science **267**:483–489.
21. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature **373**:123–126.
22. **Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature **373**:117–122.
23. **O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, D. Martin, J. Esinhart, A. Hill, S. Benoit, M. Rubin, M. S. Simberkoff, and J. D. Hamilton.** 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. N. Engl. J. Med. **334**:426–431.
24. **Welles, S. L., J. B. Jackson, B. Yen-Lieberman, L. Demeter, A. J. Japour, L. M. Smeaton, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, R. T. D'Aquila, P. A. Reichelderfer, D. D. Richman, R. Reichman, M. Fischl, R. Dolin, R. W. Coombs, J. O. Kahn, C. McLaren, J. Todd, S. Kwok, and C. S. Crumpacker.** 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA

levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. J. Infect. Dis. **174**:696–703.

25. **Coombs, R. W., S. L. Welles, C. Hooper, P. S. Reichelderfer, R. T. D'Aquila, A. J. Japour, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, D. D. Richman, S. Kwok, J. Todd, J. B. Jackson, V. DeGruttola, C. S. Crumpacker, and J. Kahn.** 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. J. Infect. Dis. **174**:704–712.
26. **Hammer, S., C. Crumpacker, R. D'Aquila, B. Jackson, J. Lathey, D. Livnat, and P. Reichelderfer.** 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. J. Clin. Microbiol. **31**:2557–2564.
27. **Schochetman, G., and J. R. George**, ed. 1994. AIDS Testing: A Comprehensive Guide To Technical, Medical, Social, Legal and Management Issues, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
28. **Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, and S. Kwok.** 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. J. Clin. Microbiol. **32**:292–300.
29. **Dewar, R. L., H. C. Highbarger, M. D. Sarmiento, J. A. Todd, M. B. Vasudevachari, R. T. Davey, Jr., J. A. Kovacs, N. P. Salzman, H. C. Lane, and M. S. Urdea.** 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. J. Infect. Dis. **170**:1172–1179.
30. **van Gemen, B., T. Kievits, R. Schukkink, D. van Strijp, L. T. Malek, R. Sooknanan, H. G. Huisman, and P. Lens.** 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. J. Virol. Methods **43**:177–187.
31. **Centers for Disease Control and Association of Public Health Laboratories.** 2014. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: Updated recommendations.
32. **Pandori, M. W., J. Hackett Jr., B. Louie, A. Vallari, T. Dowling, S. Liska, and J. D. Klausner.** 2009. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. J. Clin. Microbiol. 47:2639-2642.
33. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2005. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA.
34. **29 CFR Part 1910.1030.** Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; current version.
35. **Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL); current version.
36. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. Clinical Laboratory Waste Management. CLSI Document GP5-A2. Villanova, PA.
37. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
38. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

IVD CE 0843

Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

EC REP

EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, Den Haag
Niederlande

Kundensupport: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com
Technischer Kundendienst: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Weitere Kontaktinformationen finden Sie unter www.hologic.com.

HOLOGIC, Aptima und Panther und assoziierte Logos sind Marken oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Armored RNA ist eine Marke der Asuragen, Inc.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

Dieses Produkt ist ggf. von mindestens einem US-Patent geschützt (siehe www.hologic.com/patents).

© 2014 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

AW-11853-801 Rev. 001 (DE)
2014-10